

Rodrigo Granato

**AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE UM
RECOBRIMENTO BIOCERÂMICO NANOMÉTRICO EM
IMPLANTES DENTÁRIOS: ESTUDO EM CÃES**

Florianópolis
2007

Rodrigo Granato

**AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE UM
RECOBRIMENTO BIOCERÂMICO NANOMÉTRICO EM
IMPLANTES DENTÁRIOS: ESTUDO EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE em ODONTOLOGIA, área de concentração Implantodontia.

Orientador: José Nazareno Gil
Co-orientador: Paulo Guilherme Coelho

Florianópolis
2007

RODRIGO GRANATO

**“AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE UM
RECOBRIMENTO BIOCERÂMICO NANOMÉTRICO EM
IMPLANTES DENTÁRIOS: ESTUDO EM CÃES”**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de “Mestre em Odontologia”, área de concentração Implantodontia e aprovada na forma final pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 19 de Dezembro de 2007.

Ricardo de Souza Vieira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Banca Examinadora

Orientador: José Nazareno Gil

Co-orientador: Paulo Guilherme Coelho

José Nilo de Oliveira Freire

Dedico este trabalho à minha grande família,

Romeu, Eliana, Renata, Patrícia, Priscila e Vera, agradeço todo apoio, dedicação e compreensão, pois todos os meus objetivos alcançados e que ainda tenho a alcançar eu devo a vocês.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor José Nazareno Gil, por todo apoio, amizade e ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Paulo Guilherme Coelho, pela confiança e por ter me mostrado o que é ser um pesquisador.

Ao amigo Charles Marin, pela parceria neste e em tantos outros desafios.

Mais uma vez à minha família, por tudo o que já fizeram por mim. Amo todos vocês.

À minha namorada Francine, pelo apoio, compreensão e ajuda em mais esta etapa. Amo você.

Aos colegas de mestrado e doutorado, Elisa, André, Leonardo, Gabriela, Gisele, César, Cleide, Aline, Ricardo e João Rodrigo, aprendi muito com todos vocês.

Aos amigos da residência, Fabiano, Sergio, Jonathas e Felipe, pela amizade e ajuda durante estes cursos de pós-graduação.

Aos residentes Ernesto e Nilton, pela ajuda e amizade nesta caminhada.

Às funcionárias do CEPID, Miriam, Gisella, Dolores e Nilcelia, pela amizade e apoio.

À empresa Bicon, pelo apoio dado a esta pesquisa, na figura do colega Marcelo Suzuki.

À equipe da Disciplina de Técnica Operatória da UFSC, pela ajuda prestada durante toda esta pesquisa.

Ao médico veterinário Geraldo Bernardes, pela amizade e dedicação a este estudo.

GRANATO, Rodrigo. **AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE UM RECOBRIMENTO BIOCERÂMICO NANOMÉTRICO EM IMPLANTES DENTÁRIOS: ESTUDO EM CÃES.** 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração Implantodontia) – Curso de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a fixação biomecânica e as respostas biológicas em Implantes dentários com recobrimento de superfície biocerâmico composto por Cálcio e Fósforo de espessura entre 300-500 nanômetros. Para tanto, seis cães Beagle, machos, com aproximadamente um ano e meio de idade receberam 36 implantes dentários endosseos na forma de platôs (Bicon, Boston, MA), sendo 18 com recobrimento biocerâmico (grupo experimental) e 18 sem este recobrimento (grupo controle), divididos em dois períodos *in-vivo*: 30 e 15 dias antes da eutanásia. Os implantes foram submetidos a teste de resistência ao torque em máquina de torque eletrônica até falha de interface. Após avaliação biomecânica, as peças foram individualizadas e preparadas para avaliação histomorfométrica da taxa de contato osso/implante. Os resultados mostraram um significativo aumento nas propriedades biomecânicas no grupo experimental, tanto em 15 quanto em 30 dias de osseointegração. Com relação à taxa de contato osso/implante, um aumento significativo favorável ao grupo experimental foi identificado no menor período de osseointegração(15 dias), o que indica uma propriedade do recobrimento utilizado de acelerar o processo de remodelação óssea ao redor de implante endosseos. Os resultados deste estudo sugerem que o tratamento de superfície de implantes dentários na forma de platôs através de recobrimento biocerâmico de ordem nanométrica altera positivamente a dinâmica do remodelamento ósseo ao seu redor.

Palavras-chave: Osseointegração, Implantes Dentários, Biomecânica

GRANATO, Rodrigo. **Biomechanical and Histomorphometric Evaluation of a Nanometric Bioceramic Deposition on Dental Implants: A Study in Dogs.** 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração Implantodontia) – Curso de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

ABSTACT

The purpose of this study was to evaluate the biomechanical fixation and the overall biological response of a Ca- and P- based 300-500nm thickness bioceramic deposition on dental implants. For these reason, 6 male beagle dogs with ~1.5 years of age received 36 plateau root form endosseous dental implants (Bicon LCC, Boston, MA). 18 of these implants were bioceramic coated (experimental group) and 18 without these deposition (control group). Two times *in-vivo* wound healing were analyzed: 30 and 15 days prior to euthanasia. The implants were submitted to a resistance test. They were torqued to interfacial failure at an electronic torque machine. After biomechanical evaluation, implants were individualized and prepared for histomorphometric analyses by mean of bone to implant contact rate. The results showed a significant higher in biomechanical proprieties even in 15 and 30 days of osseointegration. With respect to the bone to implant contact rate, a significant increase in the experimental group was observed in short period of wound healing. These corroborated with the deposition propriety of faster the bone remodeling around endosseous implants. The results of this study suggest that a nanometric bioceramic deposition positively modulated the wound healing dynamics around plateau root form dental implants.

Key-words: Osseointegration, Dental Implants, Biomechanics

SUMÁRIO

RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	06
INTRODUÇÃO.....	08
METODOLOGIA.....	11
ARTIGO – Versão em Português.....	14
MANUSCRIPT – Versão em inglês.....	35
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	50
APÊNDICE.....	53

INTRODUÇÃO

A osseointegração é um fenômeno onde ocorre o íntimo contato entre o osso e um biomaterial ao nível de microscopia ótica, permitindo a substituição de órgãos deficitários por implantes cirúrgicos, restaurando forma e a função. (Albrektsson, et al. 1981)

Especialmente na implantodontia oral, onde a terapia clássica supera 90% de taxas de sucesso, alterações no design dos implantes têm sido muito estudadas com o intuito de reduzir o período de reparo necessário para o estabelecimento da osseointegração, diminuindo o tempo de tratamento. (Berglundh, et al. 2005)

Uma vez que a superfície do implante é a primeira parte a entrar em contato com hospedeiro, tem se dado muita atenção as maneiras de se aumentar sua biocompatibilidade e osseointegrabilidade dessa região. (Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004) Modificações nas superfícies tiveram grande sucesso aumentando as respostas do hospedeiro aos implantes cirúrgicos, resultando em maiores taxas de contato de osso ao implante e maior resistência biomecânica óssea em um menor tempo de implantação. (Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004, Mendes, et al. 2007, Buser, et al. 2004, Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, deGroot K 1990, Klokkevold, et al. 1997, Lemons 2004, Ong, et al. 2004, Orsini G, et al. 2006, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005)

As modificações de superfície dos implantes mais comumente utilizadas para aumentar a resposta biológica são aquelas que alteram a textura e a composição química desta superfície. (Buser, et al. 2004, Lemons 2004, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998) As técnicas de tratamento da superfície metálica dos implantes incluem: jateamento por micropartículas, condicionamento ácido, anodização e aplicação de spray de titânio e de hidroxiapatita.

Dentre os tratamentos químicos, a técnica de manufatura através da incorporação à superfície do implante de uma biocerâmica a base de Cálcio(CA) e Fósforo(P) tem sido a mais investigada nas últimas duas décadas. (deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992)

Estes estudos, incluindo investigações clínicas e laboratoriais, têm demonstrado que implantes recobertos por uma biocerâmica apresentam maior grau de osseocondutividade e atingem maior grau de fixação biomecânica em um menor período de osseointegração, quando comparados com implantes sem este tipo de tratamento. (deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992)

A maior parte dos recobrimentos biocerâmicos comercialmente disponíveis são processados com uma espessura de 20-50 μm através de spray de plasma de hidroxiapatita(PSHA). (Ong, et al. 2004, Yang, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992, Lacefield 1988, Lemons 1999) Entretanto, devido a falta de uniformidade da espessura e da composição destes recobrimentos, estes podem ser dissolvidos/reabsorvidos após um período incerto de função *in-vivo*. (deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Yang, et al. 2005, Lemons 1999) Somado a esta característica negativa, a interface entre o metal do implante e a camada de biocerâmica mostrou-se um ponto fraco, onde falhas de adesividade têm sido relatadas. (Lacefield 1998, Kay 1992, Lacefield 1988)

Buscando os benefícios de aumentar as propriedades osseocondutivas(Ong, et al. 2004) e diminuir o período de osseointegração observadas no uso de recobrimentos de superfície à base de Ca e P, têm sido desenvolvidos variações de recobrimentos em escala reduzida. (Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Ong, et al. 2004, Orsini, et al. 2006, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) As técnicas de aplicação da biocerâmica incluem a deposição de uma camada de espessura extremamente reduzida(poucos micrometros) comparada àquelas que utilizam PSHA(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005) , ou a utilização de pequenas partículas em escala Nanométrica. (Orsini, et al. 2006)

O controle da qualidade da deposição de Ca e P, bem como sua espessura e da micro/macro texturização da superfície metálica influenciam na sua capacidade de dissolução *in-vivo*(Yang, et al. 2005) alterando também o processo de remodelamento ósseo ao redor dos implantes. Após a instalação do dispositivo, a dissolução do recobrimento expõe o substrato metálico do implante. Com a total dissolução do recobrimento biocerâmico a partir da adaptação do implante, pode-se ter um íntimo contato entre o osso e sua

superfície metálica, tornando-se uma vantagem comparada aos recobrimentos de PSHA. (Lacefield 1998)

Pesquisas previas, acerca de tratamentos de superfície biocerâmicos em escala micrométrica(Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) e nanométrica(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Orsini, et al. 2006), têm mostrado resultados histomorfométricos(Ong, et al. 2004, Orsini, et al. 2006, Park, et al. 2005) e biomecânicos superiores a implantes sem este tipo de tratamento em curtos(Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Coelho P.G. & Suzuki M. 2005) e longos(Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) períodos de osseointegração. Estes promissores resultados são comparáveis aos valores obtidos pelos espessos recobrimentos de PSHA(Lemons 2004, Yang, et al. 2005, Burgess, et al. 1999), porém sem a característica de falha na interface cerâmica/metal. Os números também comprovam a possibilidade de se adquirir a osseointegração através de alterações químicas da superfície dos implantes associada a alterações topográficas de ordem nanométrica. (Mendes, et al. 2007)

Embora tenha-se atingido resultados promissores com o emprego de modificações de superfície de implantes em escala nanométrica(Mendes, et al. 2007, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005, Lacefield 1998, Coelho P.G. & Suzuki M. 2005, Coelho PG, et al. 2006, Ong, et al. 2002), a literatura a respeito é rara e controversa com respeito ao desenvolvimento de um design específico, devido aos diferentes processos de incorporação e mensuração do recobrimento.

O propósito deste estudo foi avaliar a fixação biomecânica e a resposta biológica de uma deposição biocerâmica a base de Ca e P, de espessura entre 300-500 μm , aplicada sobre um implante endosseio confeccionado em liga Ti-6Al-4V, previamente tratado com óxido de alumínio e ataque ácido. O estudo utilizou um modelo animal em cães.

METODOLOGIA

MATERIAIS

Neste estudo foram utilizados implantes endosseos na forma de raiz em liga Ti-6Al-4V com 4.5mm de diâmetro e 11mm de comprimento. Um hexágono externo foi especialmente confeccionado no topo dos implantes para possibilitar a realização dos testes mecânicos. (Figura 1)

Foram utilizados um grupo de implantes controle (n=18, com jateamento de alumina e ataque ácido sem recobrimento biocerâmico, $R_a = 0.66 \pm 0.10^{17}$), e um grupo de implantes experimental (n=18, com jateamento de alumina e ataque ácido com recobrimento biocerâmico (Nanotite™, Bicon LLC, Boston, MA))

A caracterização físico/química da superfície Nanotite™ utilizada neste estudo apresenta um recobrimento a base de Cálcio e Fósforo com 300-500 nm de espessura e estrutura atômica amorfa (Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005). Devido a fina camada do recobrimento a rugosidade da superfície não é alterada significativamente ($R_a = 0.48 \pm 0.10^{17}$ um). (Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005)

MÉTODOS

Foram utilizados seis cães da raça beagle, machos, com aproximadamente 1,5 anos (com crescimento ósseo estabilizado), em boas condições de saúde. Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina os animais foram mantidos por duas semanas antes dos procedimentos cirúrgicos já nas instalações que permaneceriam durante a pesquisa.

O campo cirúrgico foi a superfície proximal da Tíbia, onde seis implantes foram instalados em cada membro. O primeiro implante foi posicionado 2cm abaixo da junta femoral centralmente no sentido médio-lateral. Os outros cinco dispositivos foram distribuídos ao longo da tíbia no sentido distal, distando pelo menos 1cm entre cada implante. A distribuição por animal, membro e sitio cirúrgico para os períodos de 2 e 4 semanas de reparo

comparando as superfícies controle e Nanotite™ resultou em um número igual (n=9) de implantes por grupo de avaliação de tempo *in vivo*.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral.

Os cuidados pré-anestésicos incluíram administração intra-muscular(IM) de Sulfato de Atropina(0.044mg/Kg) e Cloridrato de Xilasina (8mg/Kg). A anestesia geral foi realizada pela administração IM de Cloridrato de Ketamina(15mg/Kg).

Após tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico e regiões adjacentes com solução a base de iodo, foi realizada uma incisão na pele de aproximadamente 5 cm de comprimento. Na seqüência a musculatura e o periósteo da região foram rebatidos e a tíbia exposta.

Foram realizadas seis osteotomias distando pelo menos 1 cm uma da outra ao longo da tíbia. A primeira fresagem foi realizada por uma broca piloto de 2mm de diâmetro a 1200 rpm sob irrigação salina na profundidade de 11mm. As fresagens subseqüentes foram realizadas em baixa rotação com os diâmetros das brocas na seqüência de 2.5mm, 3.0mm, 3.5mm, 4.0mm e 4.5mm. Os implantes foram então comprimidos por pressão manual para o interior das osteotomias.

Um parafuso de cobertura foi instalado sobre cada implante para evitar a formação de um calo ósseo sobre os implantes e um possível dano a interface osso/implante durante a remoção deste calo. (Figura 2) Para o fechamento tecidual foi utilizada técnica de sutura por planos (vicryl 4.0 para camadas internas e nylon 4.0 para a pele). A medicação pós-operatória incluiu Antibióticos (Penicilina, 20.000UI/Kg) e Analgésicos (Ketoprofeno, 1ml/5Kg) por um período de 48 horas. A eutanásia foi realizada por overdose anestésica.

Durante a necropsia, o terço superior do membro inferior foi exposto por delicada dissecação, o tecido mole removido por lâminas cirúrgicas e realizou-se a avaliação clínica inicial dos implantes para verificar sua estabilidade. Se algum implante estivesse clinicamente instável, este seria excluído do estudo.

Para os testes biomecânicos, os blocos ósseos com os implantes foram adaptados a uma máquina de torque eletrônica equipada com uma célula de carga de torque de 2000 N.cm(Test Resources, Minneapolis, USA). Adaptadores especificamente confeccionados foram adaptados ao hexágono externo dos implantes e os blocos ósseos cuidadosamente posicionados para

minimizar angulações durante os testes. (Figura 3a) Os implantes receberam torque até que houvesse falha de interface na taxa de aproximadamente 0.19618 radians/sec. (Figura 3b). Uma curva de torque versus deslocamento foi gravada para cada espécime. A máquina de torque foi programada para interromper a mensuração assim que uma queda de 10% a partir da maior carga fosse detectada. O propósito desta manobra foi minimizar danos a interface osso/implante antes da avaliação histológica. Valores de torque inferiores a 10 N.cm foram considerados falhas e excluídos da análise estatística.

Após os testes biomecânicos as tíbias foram seccionadas em 6 blocos individuais com um implante no centro de cada bloco. As peças foram fixadas em solução de formalina a 10% durante 5 dias, desidratadas em uma sequência gradativa de soluções alcoólicas e embebidas em resina à base de acrilato (Technovit 9100, Kulzer GmbH, Germany). Através de uma serra diamantada (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, USA), foram obtidas secções com aproximadamente 300 µm de espessura. Estas secções foram coladas a placas de acrílico e gradativamente polidas até uma espessura final de aproximadamente 30 µm.

A histomorfologia óssea foi avaliada em vários níveis de magnificação. A porcentagem de contato osso/implante (BIC) foi determinada de 50x-200x de magnificação (Leica DM4000, Wetzlar, Germany) por um software específico. (Leica Application Suite, Heerbrug, Switzerland) A método estatístico utilizado para torque e BIC foi ANOVA com nível de significância de 95% confirmação com Teste de Tukey para comparações múltiplas.

ARTIGO

AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTE NANOTITE: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES.

Este artigo está formatado segundo
as normas de elaboração da revista:

Clinical Oral Implants Research

INTRODUÇÃO

A osseointegração é um fenômeno onde ocorre o íntimo contato entre o osso e um biomaterial ao nível de microscopia ótica, permitindo a substituição de órgãos deficitários por implantes cirúrgicos, restaurando forma e a função. (Albrektsson, et al. 1981)

Especialmente na implantodontia oral, onde a terapia clássica supera 90% de taxas de sucesso, alterações no design dos implantes têm sido muito estudadas com o intuito de reduzir o período de reparo necessário para o estabelecimento da osseointegração, diminuindo o tempo de tratamento. (Berglundh, et al. 2005)

Uma vez que a superfície do implante é a primeira parte a entrar em contato com hospedeiro, tem se dado muita atenção as maneiras de se aumentar sua biocompatibilidade e osseointegrabilidade dessa região. (Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004) Modificações nas superfícies tiveram grande sucesso aumentando as respostas do hospedeiro aos implantes cirúrgicos, resultando em maiores taxas de contato de osso ao implante e maior resistência biomecânica óssea em um menor tempo de implantação. (Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004, Mendes, et al. 2007, Buser, et al. 2004, Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, deGroot K 1990, Klokkevold, et al. 1997, Lemons 2004, Ong, et al. 2004, Orsini G, et al. 2006, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005)

As modificações de superfície dos implantes mais comumente utilizadas para aumentar a resposta biológica são aquelas que alteram a textura e a composição química desta superfície. (Buser, et al. 2004, Lemons 2004, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998) As técnicas de tratamento da superfície metálica dos implantes incluem: jateamento por micropartículas, condicionamento ácido, anodização e aplicação de spray de titânio e de hidroxiapatita.

Dentre os tratamentos químicos, a técnica de manufatura através da incorporação à superfície do implante de uma biocerâmica a base de Cálcio(Ca) e Fósforo(P) tem sido a mais investigada nas últimas duas décadas. (deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992)

Estes estudos, incluindo investigações clínicas e laboratoriais, têm demonstrado que implantes recobertos por uma biocerâmica apresentam maior grau de osseocondutividade e atingem maior grau de fixação biomecânica em um menor período de osseointegração, quando comparados com implantes sem este tipo de tratamento. (deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992)

A maior parte dos recobrimentos biocerâmicos comercialmente disponíveis são processados com uma espessura de 20-50 μm através de spray de plasma de hidroxiapatita(PSHA). (Ong, et al. 2004, Yang, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992, Lacefield 1988, Lemons 1999) Entretanto, devido a falta de uniformidade da espessura e da composição destes recobrimentos, estes podem ser dissolvidos/reabsorvidos após um período incerto de função *in-vivo*. (deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Yang, et al. 2005, Lemons 1999) Somado a esta característica negativa, a interface entre o metal do implante e a camada de biocerâmica mostrou-se um ponto fraco, onde falhas de adesividade têm sido relatadas. (Lacefield 1998, Kay 1992, Lacefield 1988)

Buscando os benefícios de aumentar as propriedades osseocondutivas(Ong, et al. 2004) e diminuir o período de osseointegração observadas no uso de recobrimentos de superfície à base de Ca e P, têm sido desenvolvidos variações de recobrimentos em escala reduzida. (Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Ong, et al. 2004, Orsini, et al. 2006, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) As técnicas de aplicação da biocerâmica incluem a deposição de uma camada de espessura extremamente reduzida(poucos micrometros) comparada àquelas que utilizam PSHA(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005) , ou a utilização de pequenas partículas em escala Nanométrica. (Orsini, et al. 2006)

O controle da qualidade da deposição de Ca e P, bem como sua espessura e da micro/macro texturização da superfície metálica influenciam na sua capacidade de dissolução *in-vivo*(Yang, et al. 2005) alterando também o processo de remodelamento ósseo ao redor dos implantes. Após a instalação do dispositivo, a dissolução do recobrimento expõe o substrato metálico do implante. Com a total dissolução do recobrimento biocerâmico a partir da adaptação do implante, pode-se ter um íntimo contato entre o osso e sua

superfície metálica, tornando-se uma vantagem comparada aos recobrimentos de PSHA. (Lacefield 1998)

Pesquisas previas, acerca de tratamentos de superfície biocerâmicos em escala micrométrica(Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) e nanométrica(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Orsini, et al. 2006), têm mostrado resultados histomorfométricos(Ong, et al. 2004, Orsini, et al. 2006, Park, et al. 2005) e biomecânicos superiores a implantes sem este tipo de tratamento em curtos(Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Coelho P.G. & Suzuki M. 2005) e longos(Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) períodos de osseointegração. Estes promissores resultados são comparáveis aos valores obtidos pelos espessos recobrimentos de PSHA(Lemons 2004, Yang, et al. 2005, Burgess, et al. 1999), porém sem a característica de falha na interface cerâmica/metal. Os números também comprovam a possibilidade de se adquirir a osseointegração através de alterações químicas da superfície dos implantes associada a alterações topográficas de ordem nanométrica. (Mendes, et al. 2007)

Embora tenha-se atingido resultados promissores com o emprego de modificações de superfície de implantes em escala nanométrica(Mendes, et al. 2007, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005, Lacefield 1998, Coelho P.G. & Suzuki M. 2005, Coelho PG, et al. 2006, Ong, et al. 2002), a literatura a respeito é rara e controversa com respeito ao desenvolvimento de um design específico, devido aos diferentes processos de incorporação e mensuração do recobrimento.

O propósito deste estudo foi avaliar a fixação biomecânica e a resposta biológica de uma deposição biocerâmica a base de Ca e P, de espessura entre 300-500 μm , aplicada sobre um implante endosseio confeccionado em liga Ti-6Al-4V, previamente tratado com óxido de alumínio e ataque ácido. O estudo utilizou um modelo animal em cães.

MATERIAIS E METODOS

MATERIAIS

Neste estudo foram utilizados implantes endosseos na forma de raiz em liga Ti-6Al-4V com 4.5mm de diâmetro e 11mm de comprimento. Um hexágono

externo foi especialmente confeccionado no topo dos implantes para possibilitar a realização dos testes mecânicos. (Figura 1)

Foram utilizados um grupo de implantes controle (n=18, com jateamento de alumina e ataque ácido sem recobrimento biocerâmico, $R_a = 0.66 \pm 0.10^{17}$), e um grupo de implantes experimental (n=18, com jateamento de alumina e ataque ácido com recobrimento biocerâmico (Nanotite™, Bicon LLC, Boston, MA))

A caracterização físico/química da superfície Nanotite™ utilizada neste estudo apresenta um recobrimento a base de Cálcio e Fósforo com 300-500 nm de espessura e estrutura atômica amorfa (Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005). Devido a fina camada do recobrimento a rugosidade da superfície não é alterada significativamente ($R_a = 0.48 \pm 0.10^{17}$ um). (Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005)

MÉTODOS

Foram utilizados seis cães da raça beagle, machos, com aproximadamente 1,5 anos (com crescimento ósseo estabilizado), em boas condições de saúde. Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina os animais foram mantidos por duas semanas antes dos procedimentos cirúrgicos já nas instalações que permaneceriam durante a pesquisa.

O campo cirúrgico foi a Tíbia proximal, onde seis implantes foram instalados em cada membro. O primeiro implante foi posicionado 2cm abaixo da junta femural centralmente no sentido médio-lateral. Os outros cinco dispositivos foram distribuídos ao longo da tíbia no sentido distal, distando pelo menos 1cm entre cada implante. A distribuição por animal, membro e sítio cirúrgico para os períodos de 2 e 4 semanas de cicatrização comparando as superfícies controle e Nanotite™ resultou em um número igual (n=9) de implantes por grupo de avaliação de tempo *in vivo*.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral.

Os cuidados pré-anestésicos incluíram administração intra-muscular(IM) de Sulfato de Atropina(0.044mg/Kg) e Cloridrato de Xilasina (8mg/Kg). A anestesia geral foi realizada pela administração IM de Cloridrato de Ketamina(15mg/Kg).

Após tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico e regiões adjacentes com solução a base de iodo, foi realizada uma incisão na pele de aproximadamente 5 cm de comprimento. Na sequência a musculatura e o periósteo da região foram rebatidos e a tíbia exposta.

Foram realizadas seis osteotomias distando pelo menos 1 cm uma da outra ao longo da tíbia. A primeira fresagem foi realizada por uma broca piloto de 2mm de diâmetro a 1200 rpm sob irrigação salina na profundidade de 11mm. As fresagens subseqüentes foram realizadas em baixa rotação com os diâmetros das brocas na sequência de 2.5mm, 3.0mm, 3.5mm, 4.0mm e 4.5mm. Os implantes foram então comprimidos por pressão manual para o interior das osteotomias.

Um parafuso de cobertura foi especialmente confeccionado e instalado sobre cada implante para evitar a formação de um calo ósseo sobre os implantes e um possível dano a interface osso/implante durante a remoção deste calo. (Figura 2) Para o fechamento tecidual foi utilizada técnica de sutura por planos (vicryl 4.0 para camadas internas e nylon 4.0 para a pele). A medicação pós-operatória incluiu Antibióticos (Penicilina, 20.000UI/Kg) e Analgésicos (Ketoprofeno, 1ml/5Kg) por um período de 48 horas. A eutanásia foi realizada por overdose anestésica.

Durante a necropsia, o terço superior do membro inferior foi exposto por delicada dissecação, o tecido mole removido por lâminas cirúrgicas e realizou-se a avaliação clínica inicial dos implantes para verificar sua estabilidade. Se algum implante estivesse clinicamente instável, este seria excluído do estudo.

Para os testes biomecânicos, os blocos ósseos com os implantes foram adaptados a uma máquina de torque eletrônica equipada com uma célula de carga de torque de 2000 N.cm (Test Resources, Minneapolis, USA). Adaptadores especificamente confeccionados foram adaptados ao hexágono externo dos implantes e os blocos ósseos cuidadosamente posicionados para minimizar angulações durante os testes. (Figura 3a) Os implantes receberam torque até que houvesse falha de interface na taxa de aproximadamente 0.19618 radians/sec. (Figura 3b). Uma curva de torque versus deslocamento foi gravada para cada espécime. A máquina de torque foi programada para interromper a mensuração assim que uma queda de 10% a partir da maior carga fosse detectada. O propósito desta manobra foi minimizar danos a

interface osso/implante antes da avaliação histológica. Valores de torque inferiores a 10 N.cm foram considerados falhas e excluídos da análise estatística.

Após os testes biomecânicos as tíbias foram seccionadas em 6 blocos individuais com um implante no centro de cada bloco. As peças foram fixadas em solução de formalina a 10% durante 5 dias, desidratadas em uma sequência gradativa de soluções alcoólicas e embebidas em resina à base de acrilato (Technovit 9100, Kulzer GmbH, Germany). Através de uma serra diamantada (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, USA), foram obtidas secções com aproximadamente 300 µm de espessura. Estas secções foram coladas a placas de acrílico e gradativamente polidas até uma espessura final de aproximadamente 30 µm.

A histomorfologia óssea foi avaliada em vários níveis de magnificação. A porcentagem de contato osso/implante (BIC) foi determinada de 50x-200x de magnificação (Leica DM4000, Wetzlar, Germany) por um software específico. (Leica Application Suite, Heerbrug, Switzerland) A método estatístico utilizado para torque e BIC foi ANOVA com nível de significância de 95% confirmação com Teste de Tukey para comparações múltiplas.

RESULTADOS

Os procedimentos cirúrgicos e os acompanhamentos não apresentaram nenhuma complicação relativa aos procedimentos, infecções pós-operatórias ou qualquer outra situação clínica indesejável. Nenhum implante foi excluído do estudo devido à instabilidade clínica após a eutanásia.

A ANOVA mostrou valores de torque para falha de interface significativamente maiores para o grupo NanotiteTM comparando-se ao grupo controle ($p < 0.0001$). Os valores de torque para falha de interface em 2 semanas *in vivo* foram 40.25 ± 13.05 Ncm ($n=9$) e 71.41 ± 13.05 Ncm ($n=9$) para os grupos controle e NanotiteTM, respectivamente. Em 4 semanas *in vivo* os valores foram 38.54 ± 14.81 Ncm ($n=7$) e 132.81 ± 13.05 Ncm ($n=9$) para os grupos controle e NanotiteTM, respectivamente.

O resumo estatístico e a divisão por grupos são apresentados na figura 4. Não foram computados os valores do torque para dois implantes do grupo controle de 4 semanas devido a uma sobrecarga da máquina durante o teste.

O processamento não-descalcificado das amostras após os testes de torque evidenciaram contato direto de osso ao longo da maior parte da superfície dos implantes em regiões de osso cortical e medular para todos os grupos. (Figura 5) Um maior aumento na região de interface osso/implante mostrou que após os testes biomecânicos as secções não-descalcificadas obtidas, apresentaram mínima distorção morfológica decorrente da ruptura óssea durante o teste mecânico. (Figuras 5 e 6) Nenhuma evidência do delgado filme biocerâmico de recobrimento foi observado nos cortes histológicos devido às dimensões reduzidas de espessura da superfície Nanotite™.

O padrão de reparo tecidual observado entre os platôs dos implantes para ambos os grupos segue o tipo de ossificação intramembranosa descrita por Berglundh et al. (2003). Nas extremidades dos platôs, onde existia contato direto entre o osso e o implante durante sua inserção, foi observado reparo ósseo aposicional (Albrektsson, et al. 1981, Berglundh, et al. 2003). Mesmo apresentando o mesmo modo de reparo em ambos os grupos, foram encontradas diferenças morfológicas entre os grupos com diferente superfície em diferentes tempos *in vivo*. (Figura 6a-e)

Em duas semanas *in vivo* o osso entre os platôs dos implantes Nanotite™ apresentou maior grau de organização comparado ao grupo controle. (Figura 6a-b) Este maior grau de organização foi detectado pela presença de um arranjo estrutural ósseo sugestivo de uma formação lamelar inicial ao redor da vasta rede de vasos sanguíneos presente entre os platôs. (Berglundh, et al. 2003) O osso no grupo controle de duas semanas apresentou aspecto de osso imaturo e não se observou características de organização inicial. (Figura 6a) Independente do tipo de superfície, foram observados sinais de reabsorção óssea nas extremidades dos platôs, onde existiu um íntimo contato osso/implante (devido à técnica de inserção sob pressão) logo após seu posicionamento. (Figura 6)

Em quatro semanas *in vivo*, no grupo Nanotite™, foi observado remodelamento ósseo nas extremidades dos platôs e entre eles, onde também

foi encontrado osso lamelar circundando estruturas vasculares, compatível com uma estrutura osteogênica primária. (Figura 6e)

A morfologia observada para o grupo controle de quatro semanas não mostrou sinais de evolução comparados com o grupo controle de duas semanas.

ANOVA mostrou valores significantes maiores de BIC nos implantes Nanotite™ em duas semanas comparados ao grupo controle ($p < 0.0001$). Os valores do BIC foram $63.03 \pm 5.37 \%$ ($n=9$) e $80.91 \pm 5.69 \%$ ($n=9$) para os grupos controle e Nanotite™ respectivamente. O resumo estatístico dos valores de BIC e a divisão por grupos estão apresentados na figura 7.

DISCUSSÃO

O sucesso na implantodontia está relacionado com a capacidade do biomaterial em permitir que ocorra reparo ósseo ao seu redor. (Albrektsson, et al. 1981) Então, procura-se o desenvolvimento de implantes dentários com maior biocompatibilidade, osseocondutividade e osseoindução, acelerando o reparo ósseo e a fixação biomecânica. (Mendes, et al. 2007, Buser, et al. 2004, Coelho PG, et al. 2006, Berglundh, et al. 2007)

Uma vez que a superfície do implante é a primeira parte a entrar em contato com o hospedeiro durante a instalação, a engenharia das superfícies tem recebido muita atenção de modo a modular positivamente a resposta do hospedeiro ao implante. Dentre os parâmetros mais modificados, a topografia e a química da superfície têm mostrado os resultados mais promissores. (Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004)

Alterações da topografia da superfície através de vários processos de confecção tem resultado em maiores valores de histomorfometria e fixação biomecânica comparados aos implantes com superfície lisa. (Albrektsson, et al. 1981, Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004) Atualmente já é consenso geral que superfícies rugosas aceleram cicatrização óssea comparada às superfícies lisas. De uma perspectiva biomecânica, uma superfície rugosa gerará melhores resultados de fixação biomecânica comparada a uma superfície lisa. Butz et al. (2006) comprovou através de técnica de nanoindentação que superfícies rugosas resultam em maiores

propriedades mecânicas comparada a superfícies lisas nos períodos iniciais de osseointegração. Seu trabalho (Butz, et al. 2006) mostrou que a cinética de reparo ósseo é positivamente alterada nos implantes com superfície rugosa, e esta característica deveria ser levada em consideração para o desenvolvimento de futuras superfícies.

Com relação às modificações químicas, as superfícies dos implantes têm sido recobertas por biocerâmicas a base de Ca e P, o que resulta num aumento da resposta do hospedeiro ao implante nos períodos iniciais de reparo ósseo. Entretanto, os recobrimentos de PSHA comercialmente disponíveis têm sua indicação clínica diminuída devido à frágil interface entre o implante e a biocerâmica, e a forte interação do osso com o recobrimento. Para contornar esta situação tem se investigado o uso de delgados filmes a base de Ca e P com espessura entre 1 μm e 5 μm . Ong et. al (2004) demonstraram que recobrimentos com aproximadamente 1 μm são uma opção vantajosa em relação aos com PSHA. Seu estudo em animais não mostrou fraca união entre osso/recobrimento/metal do implante nos testes biomecânicos. Park et. al (2005) observou resultados semelhantes onde um delgado recobrimento sobre uma superfície rugosa apresentou maiores valores de fixação biomecânica comparados com aqueles rugosos mas sem o recobrimento biocerâmico. Recentemente, Mendes et. al (2007), apresentou resultados de união entre osso e Hidroxiapatita em escala nanométrica contra superfícies tratadas apenas por ataque ácido. Mesmo com as dificuldades de interpretação das modificações das superfícies dos implantes encontradas na literatura, devido a diferentes formas dos implantes, modelos animais, sítios cirúrgicos, e tempo in vivo, pesquisas indicam que superfícies rugosas e adição de biocerâmicas a base de Ca e P beneficiam a resposta óssea inicial ao implante.

A superfície NanotiteTM utilizada neste estudo é obtida pela deposição de uma camada biocerâmica a base de Ca e P com espessura entre 300-500nm sobre uma superfície de implante previamente jateada por alumina e lavada com ácido. A caracterização previa desta superfície também mostrou que a rugosidade inicial não é alterada significativamente pela deposição da camada biocerâmica (Alumina/ácido $R_a = 0.66 \pm 0.10 \mu\text{m}$, e NanotiteTM $R_a = 0.48 \pm 0.10 \mu\text{m}$)

Logo, a superfície Nanotite™ melhora o reparo ósseo ao redor do implante devido à suas características de rugosidade e alterações químicas. Deve-se lembrar que a superfície controle utilizada neste estudo foi a mesma superfície rugosa (alumina/ácido) presente antes da deposição iônica da biocerâmica, e não uma superfície lisa.

A ausência de complicações no decorrer deste estudo permitiu uma sequência normal de reparo ao redor dos implantes. (Figura 5) A distribuição balanceada dos experimentos, comparando numero iguais de superfície de implante por animal e sua disposição ao longo da tíbia, resultou em numa melhor distribuição entre porções de osso cortical e medular nos diferentes grupos avaliados. Esta manobra diminuiu a chance de viés durante os testes mecânicos e as mensurações histomorfométricas.

Os resultados dos testes biomecânicos (Figura 4) mostraram diferenças significativas ($p < 0.0001$) entre os grupos controle e Nanotite™, em ambos os períodos in vivo. Com duas semanas in vivo, o grupo Nanotite™ apresentou valores de torque para falha de interface quase duas vezes mais alto do que os grupos controles para 2 e 4 semanas. A fixação biomecânica ficou ainda mais forte no grupo Nanotite™ para 4 semanas. Os resultados indicam que uma união entre osso/biocerâmica/implante pode estar presente, sem a inconveniência de uma má adesividade nesta interface.

Os resultados da taxa de contato osso/implante mostraram maior grau de osseointegração para o grupo Nanotite™ em relação ao grupo controle para o período de duas semanas in vivo. Em quatro semanas de osseointegração os resultados foram similares. Mesmo sem diferenças significantes para a taxa de contato osso/implante em quatro semanas de experimentação, a morfologia óssea mostrou sinais de remodelamento já em duas semanas in vivo para o grupo Nanotite™. Estes achados corroboram com os significantes valores mais altos dos testes mecânicos par o grupo Nanotite™ em 4 semanas. Já os significantes valores de torque mais altos para o grupo Nanotite™ em 2 semanas podem ser correlacionados com as taxas mais altas de BIC neste grupo. Analisando os valores dos testes de torque para o grupo Nanotite™ em 2 semanas e comparando com os resultados do grupo controle de 4 semanas,

onde não houve diferença estatística entre estes grupos com relação a taxa BIC, podemos sugerir que a maior resistência biomecânica pode ser atribuída a superfície NanotiteTM. Nossos resultados biomecânicos estão de acordo com estudos prévios, onde recobrimentos um pouco mais espessos foram utilizados (pelo menos duas vezes mais espesso do que o utilizado neste estudo) e comparados com grupos controles. (Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005)

Berglundh et al. (2003) mostrou que independente da presença de uma microtextura na superfície do implante, diferentes macro-desenhos dos implantes podem resultar em diferentes modos de reparo ósseo, alterando também sua cinética de ossificação. A sequência de eventos descrita por Berglundh et al. (2003) sugere que o estabelecimento da osseointegração esta diretamente relacionado com formas de implantes que permitem grandes áreas livres de contato com o osso. Esta rápida formação óssea ao redor de implantes que apresentam grandes áreas livres de contato com o osso é afetada por alterações na superfície do implante. Buser et al. (2004) mostrou que alterando a molhabilidade de implantes com estas áreas livres de contato, a osseointegração é positivamente influenciada nos períodos iniciais de implantação in vivo.

No presente estudo, foram utilizados implantes na forma de raiz com platôs ao invés de roscas, que foram comprimidos para o interior de osteotomias com o mesmo diâmetro dos implantes. De acordo com Berglundh et al. (2003) e Buser et al. (2004), este modelo permite formação óssea aposicional nas extremidades dos platôs e ossificação do tipo intramembranosa entre os platôs, nos períodos iniciais da osseointegração.

Os valores de torque para falha de interface (Figura 4), histomorfologia (Figura 6) e os valores da taxa de contato osso/implante (Figura 7) obtidos neste estudo confirmam que modificações de superfície dos implantes pela aplicação de recobrimento biocerâmico com 300-500 µm de espessura, alteram positivamente a dinâmica do reparo ósseo ao redor de implantes com platôs na forma de raiz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A. & Lindstrom, J., (1981) Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52: 155-170.

Berglundh, T., Abrahamsson, I. & Lindhe, J., (2005) Bone reactions to longstanding functional load at implants: An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 32: 925-932.

Albrektsson, T. & Wennerberg, A., (2004) Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 17: 536-543.

Albrektsson, T. & Wennerberg, A., (2004) Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* 17: 544-564.

Mendes, V.C., Moineddin, R. & Davies, J.E., (2007) The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials* 28: 4748-4755.

Buser, D., Broggini, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S.G., (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified sla titanium surface. *J Dent Res* 83: 529-533.

Coelho P.G. & Lemons J.E. (2005) Ibad nanothick bioceramic incorporation on metallic implants for bone healing enhancement. From physico/chemical characterization to in-vivo performance evaluation. In: ISBN, ed. *Nanotech 2005*, 316-319. Anaheim, CA.

deGroot K, K.C., Wolke JGC, deBieck-Hogervorst JM, (1990) Plasma-sprayed coating of calcium phosphate In: H. L. Yamamuro T, Wilson J ed. *Handbook of bioactive ceramics, vol ii, calcium phosphate and hydroxyapatite ceramics*, 17-25. Boca Raton: CRC Press.

Klokkevold, P.R., Nishimura, R.D., Adachi, M. & Caputo, A., (1997) Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 8: 442-447.

Lemons, J.E., (2004) Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *J Oral Implantol* 30: 318-324.

Ong, J.L., Carnes, D.L. & Bessho, K., (2004) Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* 25: 4601-4606.

Orsini G, Piatelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Platelli A & Caputi S, (2006) Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol* 77: 1984-1990.

Park, Y.S., Yi, K.Y., Lee, I.S., Han, C.H. & Jung, Y.C., (2005) The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20: 31-38.

Yang, Y., Kim, K.H. & Ong, J.L., (2005) A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying. *Biomaterials* 26: 327-337.

Lacefield, W.R., (1998) Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent* 7: 315-322.

Kay, J., (1992) Calcium phosphate coatings for dental implants. *Dental Clinics of North America* 36: 1-18.

Lacefield, W.R., (1988) Hydroxyapatite coatings. *Ann N Y Acad Sci* 523: 72-80.

Lemons, J., Dietrich-Misch F (1999) Biomaterials for dental implants In: M. CE, ed. *Contemporary implant dentistry*, 271-302. Saint Louis: Mosby, Inc.

Coelho P.G. & Suzuki M., (2005) Evaluation of an ibad thin-film process as an alternative method for surface incorporation of bioceramics on dental implants. A study in dogs. *J Appl Oral Science* 13: 87-92.

Burgess, A.V., Story, B.J., Wagner, W.R., Trisi, P., Pikos, M.A. & Guttenberg, S.A., (1999) Highly crystalline mp-1 hydroxylapatite coating. Part ii: In vivo performance on endosseous root implants in dogs. *Clin Oral Implants Res* 10: 257-266.

Coelho PG, Freire JNO, Coelho AL, Rubinger C, Silva NRF, Bottino MC & Lemons JE (2006)

Nanothickness bioceramic coatings: Improving the host response to surgical implants In: D. Liepsch, ed. *5th World Congress of Biomechanics*, 253-258. Munich, Germany: Medimont.

Ong, J.L., Bessho, K. & Carnes, D.L., (2002) Bone response to plasma-sprayed hydroxyapatite and radiofrequency-sputtered calcium phosphate implants in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17: 581-586.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J., (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 14: 251-262.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Albouy, J.P. & Lindhe, J., (2007) Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 18: 147-152.

Butz, F., Aita, H., Wang, C.J. & Ogawa, T., (2006) Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res* 85: 560-565.

FIGURAS



Figura 01



Figura 02

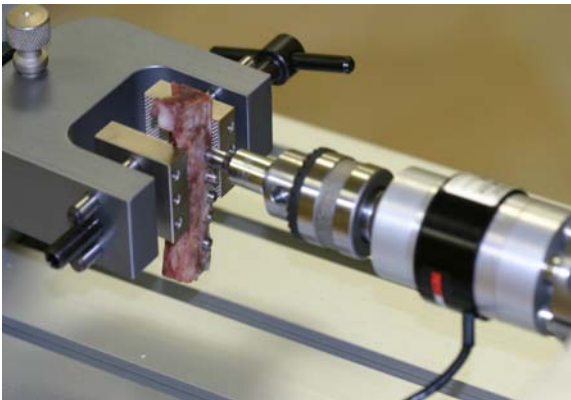


Figura 03a



Figura 03b

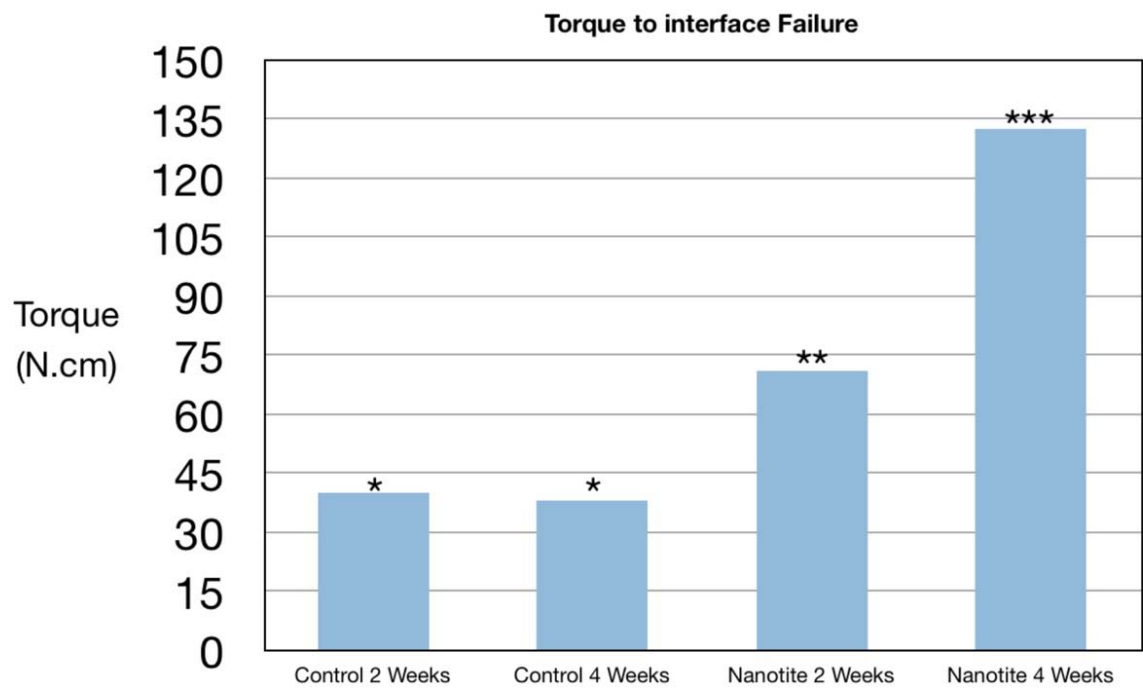


Figura 04



Figura 05

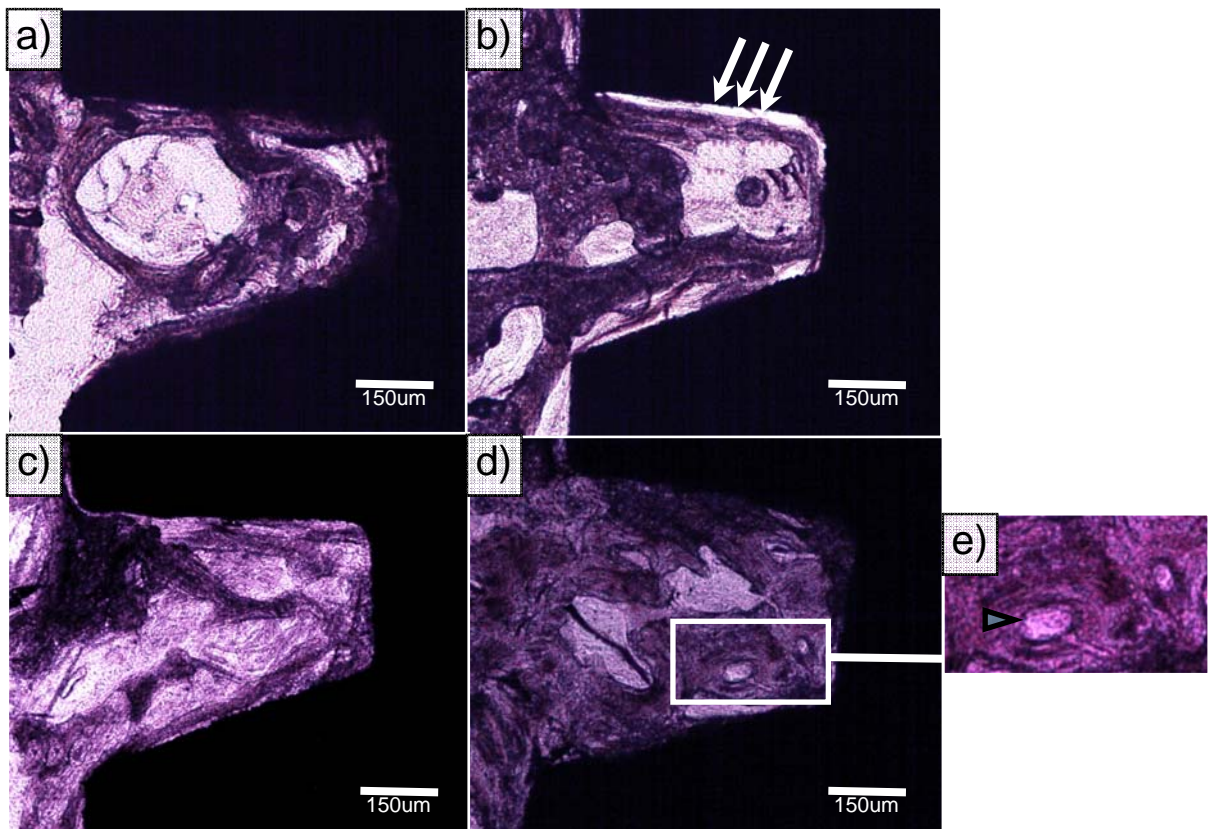


Figura 06

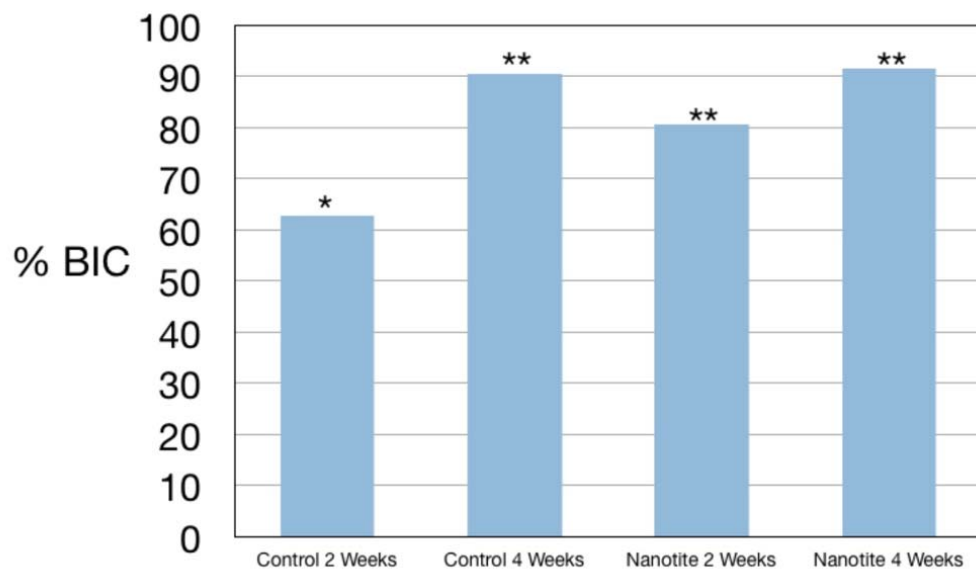


Figura 07

LEGENDAS

Figura 01: Macroestrutura do implante utilizado neste estudo. Notar o hexágono externo confeccionado especialmente para adaptação à máquina de torque.

Figura 02: Seis implantes devidamente instalados na Tíbia do animal. Os implantes estão protegidos por um parafuso de cobertura.

Figura 03a: Bloco ósseo com os implantes posicionados junto à máquina de torque eletrônica.

Figura 03b: Cuidadosa adaptação ao hexágono externo dos implantes para minimizar angulações durante o teste.

Figura 04: Resultados dos testes biomecânicos e divisão por grupos avaliados.

Figura 05: Amostra não-descalcificada após o teste de torque evidenciando contato direto de osso ao implante em regiões de osso cortical e medular.

Figura 06a-e: Microscopia óptica obtida de região de osso medular para os diferentes tipos de superfície e tempos *in-vivo*. (a) controle 2 semanas, (b) controle 4 semanas, (c) Nanotite 2 semanas e (d) Nanotite 4 semanas. Análise histomorfológica mostrou reparo ósseo intramembranoso entre os platôs, com vascularização abundante e formação óssea imatura para os grupos controles de 2 e 4 semanas e Nanotite de 2 semanas. Evidências de remodelamento ósseo só foram detectadas para o grupo Nanotite de 4 semanas, onde foi observada formação osteogênica primária(e) ao redor de vasos sanguíneos, revelando lamelas ósseas. As setas em (b) destacam o deslocamento na interface osso/implante devido ao torque durante os testes biomecânicos.

Figura 07: Resultados da taxa de contato osso/implante e divisão por grupos avaliados.

MANUSCRIPT

**BIOMECHANICAL AND HISTOMORPHOMETRIC EVALUATION
OF THE NANOTITE IMPLANT SURFACE:
AN EXPERIMENTAL STUDY IN DOGS.**

Introduction

Osseointegration is a phenomenon where intimate contact between bone and biomaterials occur at the optical microscopy level, enabling surgical implants to replace load-bearing organs restoring their form and function(Albrektsson, et al. 1981). Specific to dental implantology, where classic implant therapy success ratios often exceed 90%, alterations in implant design have been extensively revisited in order to decrease treatment time frames by reducing the healing period for osseointegration establishment (Berglundh, et al. 2005).

Since the implant surface is the first part of the implant that interacts with the host, significant attention has been devoted towards increasing the biocompatibility and osseointegration of implant surfaces(Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004). Surface modification approaches have been successful in increasing the host response to surgical implants, resulting in higher bone-to-implant contact (BIC) and higher bone mechanical properties at early implantation times.(Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004, Mendes, et al. 2007, Buser, et al. 2004, Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, deGroot K 1990, Klokkevold, et al. 1997, Lemons 2004, Ong, et al. 2004, Orsini G, et al. 2006, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) Commonly utilized modifications that increase the biological response to implants are alterations in surface texture and alteration in surface chemistry.(Buser, et al. 2004, Lemons 2004, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998)

Among surface chemistry modifications, the incorporation of Ca- and P-based bioceramic onto the implant surfaces through various manufacturing processes has been investigated throughout the last two decades.(deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992) These basic and clinical investigations have shown that bioceramic coated implants presented higher degrees of osseointegration and attained higher degrees of biomechanical fixation at earlier implantation times compared to uncoated

implants.(deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992)

Most commercially available bioceramic coatings are processed as a 20-50 μm thick Plasma Sprayed Hydroxyapatite (PSHA) coatings.(Ong, et al. 2004, Yang, et al. 2005, Lacefield 1998, Kay 1992, Lacefield 1988, Lemons 1999) However, studies have shown that due to their non uniform thickness and composition, such coatings may be partially dissolved/ resorbed after periods of in-vivo function.(deGroot K 1990, Ong, et al. 2004, Yang, et al. 2005, Lemons 1999) In addition, the interface between the bulk metal, metal oxide, and bioceramic coating has been regarded as a weak link, where adhesive failures have been reported to occur. (Lacefield 1998, Kay 1992, Lacefield 1988)

In an attempt to benefit from the increased osseoconductive(Ong, et al. 2004) properties observed in Ca- and P-based coatings while decreasing a long-term dependence on mechanical interlocking between coating and implantable device, smaller scale bioceramic coatings have been developed for implant surfaces through various processing techniques.(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Ong, et al. 2004, Orsini, et al. 2006, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) Some of these techniques are often applied in substantially thinner coating thicknesses (typically a few micrometers) compared to PSHA coatings,(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005) while other are deposited as discrete particles in the nanometer diameter range.(Orsini, et al. 2006) Controlled composition, thickness, and micro/nanoscale texturing achievable through any of these processes also influence coating dissolution in-vivo,(Yang, et al. 2005) potentially affecting osseoconductivity at early implantation times. Dissolution may also expose the metallic substrate after time has elapsed following surgical placement. Therefore, the possibility of having close bone contact to the implant metallic substrate after coating total dissolution may be an advantage presented by bioceramic thin films compared to thicker PSHA coatings(Lacefield 1998).

Previous research concerning bioceramic surface treatments in the micrometer(Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) and nanometer(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005, Orsini, et al. 2006) scale have shown static histomorphometric (such as BIC(Ong, et al. 2004, Orsini, et al. 2006, Park, et al. 2005) and osseoactivity(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005) and biomechanical

results at short(Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Coelho P.G. & Suzuki M. 2005) and long(Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005) implantation times higher than uncoated implants and somewhat comparable to thick PSHA coated implants.(Lemons 2004, Yang, et al. 2005, Burgess, et al. 1999) There has also been indication that bone bonding may be achieved through nanoscale surface topography and chemical modifications.(Mendes, et al. 2007) While promising results have been achieved through nanometer scale surface modifications,(Mendes, et al. 2007, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005, Lacefield 1998, Coelho P.G. & Suzuki M. 2005, Coelho PG, et al. 2006, Ong, et al. 2002) due to the different manufacturing processes and chemical/texture nuances between recently developed surfaces, the literature is sparse and contradictory with respect to the development of an informed design rationale for future implant systems' surfaces.

The purpose of this study was to evaluate the biomechanical fixation and the overall biological response of a Ca- and P- based 300-500nm thickness bioceramic deposition on a previously alumina-blasted/acid-etched Ti-6Al-4V implant surface in a dog model.

Materials and Methods

Materials

This study utilized plateau root form endosseous Ti-6Al-4V implants of 4.5 mm in diameter by 11 mm in length. For mechanical testing purposes, an external hexagon was machined on the top of the implants for subsequent torque testing (Figure 1).

The implant groups utilized included control (n=18, non-coated alumina-blasted/acid-etched titanium alloy substrate, $R_a = 0.66 \pm 0.10^{17}$), and experimental (n=18, Nanotite™) (Bicon LLC, Boston, MA) implants.

Preliminary physico/chemical surface characterization of the Nanotite™ implants utilized in the present study showed a 300-500 nm thickness calcium- and phosphorous- based coating with an amorphous atomic structure.(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005) Also, surface roughness was not significantly affected ($R_a = 0.48 \pm 0.10^{17}$ um) due to thin coating deposition.(Coelho P.G. & Lemons J.E. 2005)

Methods

Following approval of the bioethics committee for animal experimentation at the Universidade Federal de Santa Catarina, 6 mid-size adult (closed bone growth plates) male beagle dogs with ~1.5 years of age in good health were acquired and maintained in the animal research facility for 2 weeks prior to the surgical procedures.

The surgical region was the proximal tibia, with six implants placed in each limb. The first implant was inserted 2 cm below the joint line at the central medial-lateral position of the proximal tibiae. The remaining devices were placed along a distal direction at distances of 1 cm from each other along the central region of the bone. The animals, limbs, and surgical site distributions for the 2- and 4-week comparison for Nanotite and control surfaces resulted in an equal number (n=9) of implants per group and in vivo evaluation time.

All surgical procedures were performed under general anesthesia. The pre anesthetic procedure comprised an intra-muscular (IM) administration of Atropine Sulfate (0.044mg/Kg) and Xylasin Chlorate (8mg/Kg). General anesthesia was then obtained following a IM injection of Ketamine Chlorate (15mg/Kg).

Following trichotomy and antiseptic cleaning with iodine solution at the surgical and surrounding area, a 5 cm incision at the skin level was performed. Then, the periosteum was reflected and the proximal tibia plateau exposed. Six osteotomies were produced at least 10 mm from each other from proximal to distal. The initial drilling was performed by a 2 mm diameter pilot drill at 1200 rpm under saline irrigation. Then, slow speed sequential drilling with burs of 2.5 mm, 3.0 mm, 3.5 mm, 4.0 mm, and 4.5 mm diameter was performed. The implants were then press fit into the osteotomy sites by manual pressure. In order to avoid any damage to the implant-bone interface due to removal of a callus overgrowth after limb retrieval, a customized cover screw was installed in each implant (Figure 2). Standard layered suture techniques were utilized for wound closure (4-0 vicryl- internal layers, 4-0 nylon- the skin). Post-surgical medication included Antibiotics (Penicillin, 20.000UI/Kg) and analgesics (Ketoprophen, 1ml/5Kg) for a period of 48 hours post-operatively. The euthanasia was performed by anesthesia overdose.

At necropsy, the upper third of the limbs were retrieved by sharp dissection, the soft tissue was removed by surgical blades, and initial clinical evaluation was performed to determine implant stability. If an implant was clinically unstable, it was excluded from the study.

For biomechanical testing, the bone blocks with implants were adapted to an electronic torque machine equipped with a 2000 N.cm torque load cell (Test Resources, Minneapolis, USA). Custom machined tooling was adapted to the implants' external hexagons and the bone block was carefully positioned to minimize angulation during testing (Figure 3a). The implants were torqued to interfacial failure at a rate of ~ 0.19618 radians/sec (Figure 3b), and a torque versus displacement curve was recorded for each specimen. The torque machine was set to automatically stop the measurement when a torque drop of 10% from the highest load was detected. The rationale for this procedure was to minimize interface damage prior to histologic procedures. Torque values lower than 10 Ncm were considered failures, and were excluded from the statistical analysis.

Following biomechanical testing, the tibiae were sectioned into 6 individual blocks with one implant in each blocks center. The blocks were fixed with 10% buffered formalin for 5 days, dehydrated in graded alcohol series, and embedded in acrylate-based resin (Technovit 9100, Kulzer GmbH, Germany). Non-decalcified ground sections of ~ 300 μm thickness were then obtained by means of a diamond saw (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, USA). These sections were glued with cyanoacrylate to acrylic plates and were grounded and polished to ~ 30 μm final thickness.

Bone histomorphology was evaluated at various magnifications. The percent bone-to-implant contact (BIC) was determined at 50X-200X magnification (Leica DM4000, Wetzlar, Germany) by means of a computer software (Leica Application Suite, Heerbrug, Switzerland). Torque and BIC statistical evaluation were performed by One-way ANOVA at 95% level of significance along with Tukey's post-hoc test for multiple comparisons.

Results

Animal surgical procedures and follow-up demonstrated no complications regarding procedural conditions, post-operative infection, or other clinical concerns. No implants were excluded from the study due to clinical instability immediately after the euthanization.

One-way ANOVA showed significantly higher torque to interface failure values for the Nanotite™ implants compared to control implants ($p < 0.0001$). At 2 weeks in vivo, torque to interface failure values of 40.25 ± 13.05 Ncm ($n=9$) and 71.41 ± 13.05 Ncm ($n=9$) were observed for the control and Nanotite™ groups, respectively. At 4 weeks in vivo, torque to interface failure values of 38.54 ± 14.81 Ncm ($n=7$) and 132.81 ± 13.05 Ncm ($n=9$) were observed for the control and Nanotite™ groups, respectively. The statistics summary and homogeneous groups are presented in Figure 4. The torque to interface failure values for two implants of the 4 weeks control group were not recorded due to torque machine overshooting during testing.

The nondecalcified sample processing after torque testing showed direct bone contact along most of the implant surface at regions of cortical and trabecular bone for all groups (Figure 5). Higher magnification of the bone-implant interface region showed that the nondecalcified sections obtained following biomechanical testing presented minimal morphologic distortion due to mechanical testing bone disruption (Figures 5 and 6). Under a magnification of 40X, the bone-implant interfaces were easily visualized and facilitated bone-to-implant contact determination (Figures 5 and 6). Due to the Nanotite™ coating low thickness dimension, no evidence of the thin-film bioceramic coating was observed in the histologic sections.

The wound healing pattern observed for both groups between the implant plateaus followed the intramembranous-type healing mode described by Berglundh et al, 2003. Appositional bone healing was observed at the plateau tips where direct contact existed between implant and bone during placement. (Albrektsson, et al. 1981, Berglundh, et al. 2003)

Even though the same wound healing mode was observed for both groups, temporal morphologic differences were found for the different implant surface groups at the different times in vivo (Figure 6a-e).

At two weeks in vivo, bone between Nanotite™ implants' plateaus presented higher degrees of organization compared to the control group (Figure 6a-b). This higher degree of organization was depicted by the presence of bone structural arrangements suggestive of lamella initial formation surrounding the rich blood vessel network present between plateaus.(Berglundh, et al. 2003)

The bone between the 2 weeks control group plateaus presented a woven-like morphology and no further organization suggestive of initial modeling was observed (Figure 6a). Irrespective of implant surface, signs of resorption were observed at the plateau tips where intimate contact existed (due to press fitting insertion technique) between implant and bone immediately after placement (Figure 6).

At four weeks in vivo, bone modeling at the plateau tips and in between plateaus was observed for the Nanotite™ implants, where lamellar bone was observed surrounding an abundant vascular structure, commensurate with a primary osteonic structure (Figure 6d). The morphology observed for the 4 weeks control implants did not show depictable evolution compared to the 2 weeks control implants.

One-way ANOVA showed significantly higher BIC values for the Nanotite™ implants compared to control implants ($p < 0.0001$). At 2 weeks in vivo, BIC values of $63.03 \pm 5.37 \%$ ($n=9$) and $80.91 \pm 5.69 \%$ ($n=9$) were observed for the control and Nanotite™ groups, respectively. At 4 weeks in vivo, BIC values showed no statistically significant difference, at $90.65 \pm 5.37 \%$ ($n=9$) and $91.71 \pm 5.37 \%$ ($n=9$) for the control and Nanotite™ groups, respectively. The statistics summary and homogeneous groups are presented in Figure 7.

Discussion

The success in dental implantology is related to the implant biomaterials' ability to allow bone healing around them.(Albrektsson, et al. 1981) Thus, the development of dental implants with increased biocompatibility, osseointegration or osseointegration leading to faster bone healing and biomechanical fixation are highly desirable.(Mendes, et al. 2007, Buser, et al. 2004, Coelho PG, et al. 2006, Berglundh, et al. 2007)

Since the surface of the implant is the first part to interact with the host tissue during placement, surface engineering in an attempt to positively modulate the host to implant response has received significant attention over the past decade. Among the parameters most often modified in the past, surface topography and chemistry have shown promising results.(Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004)

Surface topography alteration through a variety of processes have resulted in increased histomorphometric and biomechanical fixation values compared to as-machined implants.(Albrektsson, et al. 1981, Albrektsson & Wennerberg 2004, Albrektsson & Wennerberg 2004) It is now general consensus that rough surfaces result in enhanced bone healing compared to as-machined surfaces. From a biomechanical perspective, bone-rough surface mechanical interlocking will generate higher biomechanical fixation results compared to smoother surfaces, and rougher surfaces are expected to present higher biomechanical fixation levels. However, in a demonstration that rougher surfaces may effectively change the bone-implant biomechanics in a property level, Butz et al. (2006), demonstrated through nanoindentation that rougher surfaces resulted in higher bone mechanical properties compared to smooth surfaces at earlier implantation times. Their(Butz, et al. 2006) work demonstrated that wound healing kinetics is positively modulated by implant surface roughness, and this feature should be taken into account during the design of future surfaces.

From a surface chemistry modification standpoint, implant surfaces have been coated with biocompatible Ca- and P-based bioceramics, also resulting in enhanced host-to-implant response at early implantation times. However, the commercially available PSHA-coated implants fell from favor in clinical practice due to the fragile interface between the implant substrate and coating, which was exceeded by the adhesion between bone and PSHA coating. In an attempt to overcome potential limitations observed for PSHA-coatings, Ca- and P-based thin-films ranging from ~1 to 5 μm have been investigated. Ong et al. showed that sputtered coatings of ~1 μm were a feasible alternative to PSHA-coated implants. Ong et al.(2004) animal studies showed that no weak links at the bone-coating-metallic substrate was depicted in biomchanical testing. Similar observations have been found by Park et al. (2005), who showed that thin

coating deposition onto rough surfaces presented higher biomechanical fixation compared to their rough (as prior to deposition) surfaces. Recently, indication of bone bonding to nanoscale HA depositions onto a dual acid-etched surface has been demonstrated.(Mendes, et al. 2007) However, simple stress calculations involving their data shows that the bonding observed was from 0-2 MPa, which will unlikely have a pivotal role on the whole system overall mechanics.

Therefore, despite the difficult interpretation of the implant surface modification literature due to different implant shapes, animal models, surgical sites, and times in vivo, past reports indicate that rough surface textures and the addition of Ca- and P-based bioceramic are beneficial to the initial bone response to implants.

The Nanotite surface utilized in the present study was a 300-500 nm deposition of a Ca- and P-based bioceramic onto an alumina-blasted/acid-etched titanium alloy substrate with amorphous microstructure. Also, previous surface characterization(Coelho PG, et al. 2006) showed that surface roughness was not significantly altered due to the bioceramic deposition (alumina-blasted/acid-etched surface $R_a = 0.66 \pm 0.10 \mu\text{m}$, and NanotiteTM $R_a = 0.48 \pm 0.10 \mu\text{m}$). Thus, the NanotiteTM potentially provided the wound healing site with both surface roughness and chemistry properties know to enhance initial bone healing around implants. It should be remarked that the control surface utilized in the present study was the same alumina-blasted/acid-etched rough surface present before Ion Beam Assisted bioceramic deposition.

The absence of complications during the course of this study allowed normal healing sequence around the implants (Figure 5). Also, the balanced surgical experiment comparing the same number of implant surfaces per animal and location in the proximal tibia resulted in better distributed cortical-to-trabecular bone ratios for the different implant groups. This procedure minimized bias during mechanical testing and histomorphometric measurements.

The biomechanical testing results (Figure 4) showed significantly differences ($P < 0.0001$) between control and NanotiteTM groups at both times in vivo. At two weeks in vivo, the NanotiteTM torque to interfacial failure was almost two times higher than the control group at 2 and 4 weeks in vivo, and biomechanical fixation further improved at 4 weeks for the Nanotite group.

These results indicate that should a bone-bioceramic-metallic substrate be present at these times in vivo (one may argue based on the literature that due to the coating microstructure and thickness, full dissolution is feasible), no weak links were present at the interface.(Yang, et al. 2002)

The %BIC results showed significantly higher degrees of osseointegration for the Nanotite™ group compared to the control at 2 weeks. At 4 weeks, the %BIC values were comparable. Despite the non significant differences of %BIC at 4 weeks in vivo, bone morphology between groups showed that initial modeling started as early as 2 weeks in vivo for the Nanotite™ group. This finding support the significantly higher torque to interface failure values observed for the Nanotite group at 4 weeks in vivo. The significantly higher torque to interface failure observed at 2 weeks in vivo may be rationalized by the significantly higher %BIC observed for the Nanotite group. Concerning the significantly higher torque for the Nanotite™ at 2 weeks compared to the control at 4 weeks while both presented non significant differences in %BIC, we speculate that higher bone mechanical properties were achieved for the Nanotite™ surface. Another possibility is bone bonding to the 300-500nm coating, which may occur as previously reported for the thick PSHA coatings, and may be the subject fo future ultrastructural Nanotite™ -bone interface studies. Our biomechanical testing results are in agreement with previous studies, where slightly thicker (at least twice as thick as utilized in the present study) deposition techniques were utilized and compared to control groups.(Ong, et al. 2004, Park, et al. 2005, Yang, et al. 2005)

Berglundh et al (2003) showed that despite the surface microtexture presence, different implant macrodesigns may result in different bone healing modes and kinetics. The sequence of events described by Berglundh et al. (2003) suggested that the establishment of osseointegration was relatively short for implants presenting large contact-free surfaces. The rapid bone formation in implants presenting large contact-free surfaces has been previously reported to be affected by surface modifications. Buser et al. (2004), showed that the changing the implant surface wettability of implants presenting large contact-free spaces positively influenced osseointegration at early implantation times in vivo.

In the present study, we utilized root form implants with plateaus which were press fit into an osteotomy of the implant diameter. In agreement with Berglundh et al (2003) and Buser et al. (2004), this model allowed appositional bone formation at the plateau tip and intramembranous-type bone formation between plateaus at early implantation times in vivo. The torque to interface failure (Figure 4), histomorphologic (Figure 6), and BIC results obtained in the present study support that the surface modification comprising a 300-500 nm bioceramic coating positively modulated the wound healing dynamics around plateau root form implants.

References

- Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A. & Lindstrom, J., (1981) Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* **52**: 155-170.
- Berglundh, T., Abrahamsson, I. & Lindhe, J., (2005) Bone reactions to longstanding functional load at implants: An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* **32**: 925-932.
- Albrektsson, T. & Wennerberg, A., (2004) Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* **17**: 536-543.
- Albrektsson, T. & Wennerberg, A., (2004) Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* **17**: 544-564.
- Mendes, V.C., Moineddin, R. & Davies, J.E., (2007) The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials* **28**: 4748-4755.
- Buser, D., Broggini, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S.G., (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* **83**: 529-533.
- Coelho P.G. & Lemons J.E. (2005) Ibad nanothick bioceramic incorporation on metallic implants for bone healing enhancement. From physico/chemical characterization to in-vivo performance evaluation. In: ISBN, ed. *Nanotech 2005*, 316-319. Anaheim, CA.

deGroot K, K.C., Wolke JGC, deBieck-Hogervorst JM, (1990) Plasma-sprayed coating of calcium phosphate In: H. L. Yamamuro T, Wilson J ed. *Handbook of bioactive ceramics, vol ii, calcium phosphate and hydroxyapatite ceramics*, 17-25. Boca Raton: CRC Press.

Klokkevold, P.R., Nishimura, R.D., Adachi, M. & Caputo, A., (1997) Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* **8**: 442-447.

Lemons, J.E., (2004) Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *J Oral Implantol* **30**: 318-324.

Ong, J.L., Carnes, D.L. & Bessho, K., (2004) Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* **25**: 4601-4606.

Orsini G, Piatelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Platelli A & Caputi S, (2006) Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol* **77**: 1984-1990.

Park, Y.S., Yi, K.Y., Lee, I.S., Han, C.H. & Jung, Y.C., (2005) The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* **20**: 31-38.

Yang, Y., Kim, K.H. & Ong, J.L., (2005) A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying. *Biomaterials* **26**: 327-337.

Lacefield, W.R., (1998) Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent* **7**: 315-322.

Kay, J., (1992) Calcium phosphate coatings for dental implants. *Dental Clinics of North America* **36**: 1-18.

Lacefield, W.R., (1988) Hydroxyapatite coatings. *Ann N Y Acad Sci* **523**: 72-80.

Lemons, J., Dietrich-Misch F (1999) Biomaterials for dental implants In: M. CE, ed. *Contemporary implant dentistry*, 271-302. Saint Louis: Mosby, Inc.

Coelho P.G. & Suzuki M., (2005) Evaluation of an ibad thin-film process as an alternative method for surface incorporation of bioceramics on dental implants. A study in dogs. *J Appl Oral Science* **13**: 87-92.

Burgess, A.V., Story, B.J., Wagner, W.R., Trisi, P., Pikos, M.A. & Guttenberg, S.A., (1999) Highly crystalline mp-1 hydroxylapatite coating. Part ii: In vivo

performance on endosseous root implants in dogs. *Clin Oral Implants Res* **10**: 257-266.

Coelho PG, Freire JNO, Coelho AL, Rubinger C, Silva NRF, Bottino MC & Lemons JE (2006)

Nanothickness bioceramic coatings: Improving the host response to surgical implants In: D. Liepsch, ed. *5th World Congress of Biomechanics*, 253-258. Munich, Germany: Medimont.

Ong, J.L., Bessho, K. & Carnes, D.L., (2002) Bone response to plasma-sprayed hydroxyapatite and radiofrequency-sputtered calcium phosphate implants in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants* **17**: 581-586.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J., (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* **14**: 251-262.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Albouy, J.P. & Lindhe, J., (2007) Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* **18**: 147-152.

Butz, F., Aita, H., Wang, C.J. & Ogawa, T., (2006) Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res* **85**: 560-565.

LEGENDS

Figure 01: Implant macrostructure used in these study. Note the external hexagon machined on the top of the implant due to adaptation at the torque machine.

Figure 02: The six implants correctly placed along the dog tibia. The implants are protects by the use of a cover screw.

Figure 03a: Bone block with the implants adapted to the electronic torque machine.

Figure 03b: Implant external hexagon carefully positioned to minimize angulations during the test.

Figure 04: The biomechanical tests statistics summary and homogenous group analyzed.

Figure 05: Nondecalcified sample after torque test showing direct bone contact to implant t regions of cortical and trabecular bone.

Figure 06: Optical micrographs obtained at the trabecular bone regions for the different implant surfaces and time *in-vivo*. (a) control 2 weeks, (b) control 4 weeks, (c) Nanotite 2 weeks and (d) Nanotite 4 weeks. Histomorphologic analysis showed an intramembranous-like bone healing between the plateaus where abundant vascularization and woven bone formation were present for the control 2 weeks, control 4 weeks and Nanotite 2 week. Evidence of bone remodeling between plateaus was only depicted for the Nanotite 4 weeks group, were (e) primary osteonic formation was observed around blood vessels revealing bone lamellae. The arrows in (b) depict the interface dislocation that likely occurred due to the torque biomechanical testing.

Figure 07: The bone to implant contact statistics summary and homogeneous groups analyzed.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A. & Lindstrom, J., (1981) Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* **52**: 155-170.

Berglundh, T., Abrahamsson, I. & Lindhe, J., (2005) Bone reactions to longstanding functional load at implants: An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* **32**: 925-932.

Albrektsson, T. & Wennerberg, A., (2004) Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* **17**: 536-543.

Albrektsson, T. & Wennerberg, A., (2004) Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* **17**: 544-564.

Mendes, V.C., Moineddin, R. & Davies, J.E., (2007) The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials* **28**: 4748-4755.

Buser, D., Broggini, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S.G., (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified sla titanium surface. *J Dent Res* **83**: 529-533.

Coelho P.G. & Lemons J.E. (2005) Ibad nanothick bioceramic incorporation on metallic implants for bone healing enhancement. From physico/chemical characterization to in-vivo performance evaluation. In: ISBN, ed. *Nanotech 2005*, 316-319. Anaheim, CA.

deGroot K, K.C., Wolke JGC, deBieck-Hogervorst JM, (1990) Plasma-sprayed coating of calcium phosphate In: H. L. Yamamuro T, Wilson J ed. *Handbook of*

bioactive ceramics, vol ii, calcium phosphate and hydroxyapatite ceramics, 17-25. Boca Raton: CRC Press.

Klokkevold, P.R., Nishimura, R.D., Adachi, M. & Caputo, A., (1997) Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* **8**: 442-447.

Lemons, J.E., (2004) Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *J Oral Implantol* **30**: 318-324.

Ong, J.L., Carnes, D.L. & Bessho, K., (2004) Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* **25**: 4601-4606.

Orsini G, Piatelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piatelli A & Caputi S, (2006) Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol* **77**: 1984-1990.

Park, Y.S., Yi, K.Y., Lee, I.S., Han, C.H. & Jung, Y.C., (2005) The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* **20**: 31-38.

Yang, Y., Kim, K.H. & Ong, J.L., (2005) A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying. *Biomaterials* **26**: 327-337.

Lacefield, W.R., (1998) Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent* **7**: 315-322.

Kay, J., (1992) Calcium phosphate coatings for dental implants. *Dental Clinics of North America* **36**: 1-18.

Lacefield, W.R., (1988) Hydroxyapatite coatings. *Ann N Y Acad Sci* **523**: 72-80.

Lemons, J., Dietrich-Misch F (1999) Biomaterials for dental implants In: M. CE, ed. *Contemporary implant dentistry*, 271-302. Saint Louis: Mosby, Inc.

Coelho P.G. & Suzuki M., (2005) Evaluation of an ibad thin-film process as an alternative method for surface incorporation of bioceramics on dental implants. A study in dogs. *J Appl Oral Science* **13**: 87-92.

Burgess, A.V., Story, B.J., Wagner, W.R., Trisi, P., Pikos, M.A. & Guttenberg, S.A., (1999) Highly crystalline mp-1 hydroxylapatite coating. Part ii: In vivo performance on endosseous root implants in dogs. *Clin Oral Implants Res* **10**: 257-266.

Coelho PG, Freire JNO, Coelho AL, Rubinger C, Silva NRF, Bottino MC & Lemons JE (2006)
Nanothickness bioceramic coatings: Improving the host response to surgical implants In: D. Liepsch, ed. *5th World Congress of Biomechanics*, 253-258. Munich, Germany: Medimont.

Ong, J.L., Bessho, K. & Carnes, D.L., (2002) Bone response to plasma-sprayed hydroxyapatite and radiofrequency-sputtered calcium phosphate implants in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants* **17**: 581-586.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J., (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* **14**: 251-262.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Albouy, J.P. & Lindhe, J., (2007) Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* **18**: 147-152.

Butz, F., Aita, H., Wang, C.J. & Ogawa, T., (2006) Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res* **85**: 560-565.

APÊNDICE

Aprovação Comissão de ética no Uso de Animais – UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa
Comissão de Ética no Uso de Animais
Fone: (048) 3331-9206 - Fax: (048) 3331-9599

Ofício nº 105/07/CEUA/PRPe

Florianópolis, 10 de julho de 2006.

Da: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): **Prof(a) Dr(a) José Nazareno Gil**
Departamento de Estomatologia-CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao Recurso 082/CEUA/PRPe de 23/06/2006 referente ao Protocolo de Pesquisa sob sua responsabilidade, cadastrado sob os números PP00036/CEUA e 23080.012371/2006-91/UFSC, intitulado “**AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE UM RECOBRIMENTO BIOCERÂMICO NANOMÉTRICO EM IMPLANTES DENTÁRIOS: ESTUDO EM CÃES**”, a Presidente deliberou o seguinte:

- **APROVADO**, o uso de 6 cães Beagles (Canis familiares – Beagle) pelo período de um ano.

Vigência: 10/11/2006 a 10/11/2007.

Por ocasião do término desse protocolo, **DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO** detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Profª. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva
Presidente da CEUA/PRPe/UFSC